

## B7-1 遺伝子導入ヒト腫瘍細胞に対する T 細胞の反応

佐々木 文

札幌医科大学病理学第1講座 (主任 菊地浩吉 教授)

### Augmentation of T cell response to human tumor cells by B7-1 transfection

Aya SASAKI

Department of Pathology (Section 1), Sapporo Medical University, School of Medicine  
(Chief: Prof. K. KIKUCHI)

**ABSTRACT** T cells require costimulatory signals through CD28 by binding with B7-1 (CD80) to induce full activation. Previous studies in mice have shown that inoculation of B7-1 positive tumor cells led to the tumor regression, and that immunization with B7-1 positive tumor cells induced protection from further challenge with the tumor even without B7-1 expression. In the present study, role of B7-1 was investigated in human allogeneic system *in vitro*. A squamous cell carcinoma line, OSC40, which is MHC class I positive, and MHC class II negative, was made immunogenic after transfection with B7-1 gene. Allogenic peripheral blood lymphocyte (PBL) pre-activated with phytohemagglutinin proved to respond efficiently to OSC40 cells transfected with human B7-1 gene, when estimated by TNF $\alpha$  production and proliferation assays. The results suggested that B7-1 expression augmented immunogenicity of tumor cells with low immunogenicity. Furthermore the findings suggested that introduction of B7-1 gene in tumor cells may be useful to generate tumor specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs). The biological significance of B7-1 expression in tumor immunology was discussed.

(Received February 5, 1997 and accepted February 20, 1997)

**Key words:** B7-1, Costimulatory signal, Tumor immunology

## 1 緒 言

T 細胞が細胞表面抗原を認識しエネルギーに陥ることなく増殖するためには、T 細胞抗原受容体 (TCR) を介した MHC 分子の抗原特異的認識のみならず、他の種々の分子間結合によるいわゆる costimulatory signal が必要であり<sup>1)</sup>、それらの分子の代表として Ig スーパーファミリーに属する B7/CD28 系があげられる。抗原提示細胞の B7 分子群 (B7-1 (CD80)<sup>2)</sup>、B7-2 (CD86)<sup>3)4)</sup> に結合して、CD28 は T 細胞の活性化の促進<sup>5)6)</sup>、CTLA4 は T 細胞の抑制の機能を担い<sup>7)8)9)</sup>、末梢における T 細胞の調節に重要な役割を果たしていると考えられる。動物モデルを用いた *in vivo* の実験では、B7 分子群に CD28 より高い親和性で結合し B7 分子群による costimulation を抑制する可溶性融合蛋白

CTLA4Ig<sup>10)</sup> の投与により、同種移植片拒絶<sup>11)12)</sup>、自己免疫疾患の発症<sup>13)14)</sup>、微生物感染に対する免疫反応<sup>15)16)</sup> が抑制されることが証明されており、あらゆる免疫応答の場で B7/CD28 系が働いていることが示唆される。

腫瘍に対する拒絶反応の costimulatory signal による増強効果についてもマウスの系で検討されており、B7 分子を導入された同系腫瘍細胞を皮下に移植すると宿主の免疫系により拒絶あるいは増殖を抑制され、以後の腫瘍細胞の移植に際してワクチン効果があることが示されている<sup>17)18)</sup>。また抗 CTLA4 抗体で抑制性シグナルを減弱させることにより腫瘍拒絶が増強するとの報告もある<sup>19)</sup>。以上より costimulatory signal の制御により腫瘍の免疫療法を修飾できる可能性が示唆される。しかしヒト腫瘍においてはまだ確かめられていない。

我々は、ヒトの上皮系腫瘍についてその自己リンパ球の細胞傷害機構、癌拒絶抗原の検索を行ってきたが、上皮系腫瘍はメラノーマと比して一般に免疫原性が弱い。CTLの誘導は困難であった。そこで腫瘍細胞にB7分子を導入することにより、自己リンパ球に対して効果的に癌拒絶抗原刺激を与える方法が考えられるが、その際の問題点としてまず腫瘍そのものに抗原性がなければ costimulatory signal を加えてもリンパ球の応答は期待出来ない可能性があげられる<sup>20)</sup>。第二の問題は、これまで明らかにされてきたCD28のT細胞活性化機構の多くは抗CD28抗体と抗CD3抗体刺激によるものであり、抗CD28抗体刺激とnatural ligand刺激では細胞内シグナルの質が異なる場合もあることから<sup>21)</sup>、B7分子を導入された腫瘍細胞が期待されるT細胞の反応を引き起こすかどうか不明な点である。そこで著者は抗原性が確かであると思われるヒト同種の系を用いて、*in vitro*でCTLを誘導する際にB7分子を導入された上皮系腫瘍細胞が抗原性を増強し得るかどうか、また我々が従来行ってきたMLTC(mixed lymphocyte tumor cell culture)におけるB7分子の役割についての検討を行った。

## 2 材料と方法

### 2.1 使用細胞

腫瘍細胞は、当教室で樹立された口底重層扁平上皮癌細胞株OSC40を使用した。OSC40は10% FCS添加RPMI-1640培養液(ニッスイ)にて継代培養した。末梢リンパ球(PBL)は、健康人末梢血よりFicoll-Conray比重遠心法(比重1.082)により単核球を分離し、recombinant(r)IL-2 100U/ml(Takeda Chemical, Tokyo)添加AIM-V無血清培養液(GIBCO BRL, Grand Island, NY)にて培養開始、12時間後に付着細胞を除いた浮遊細胞のみをさらに同じ培養条件で維持した。PHA刺激リンパ球は、分離培養開始時に上記培養液にPhytohemagglutinin(PHA) 5 µg/ml(SIGMA, St. Louis, MO)を加えた。いずれのリンパ球も、分離後5~6日でアッセイもしくは初回のMLTCを行った。

### 2.2 使用抗体

抗MHC class I抗体; clone W6/32 (IgG2a) (American Type Culture Collection, Rockville, MD), 抗MHC class II抗体; clone TC8B1, 抗CD3抗体; clone EF3, 抗CD25 (IL-2Rα)抗体; clone TH9A5, 抗CD28抗体; clone L293(Becton Dickinson, Mountain View, CA), 抗CD54 (ICAM-1)抗

体; clone HA58(札幌医大第一内科, 今井浩三先生よりご提供いただいた。), 抗CD80 (抗BB1/B7)抗体; clone L307.4 (Becton Dickinson, Mountain View, CA), 抗CTLA-4抗体; goat polyclonal (Santa Cruz, CA), 抗ラットCD4抗体; clone RTH7 (IgG2a)

### 2.3 フローサイトメトリーによる解析

上記の抗体のうち抗CD80抗体はphycoerythrin(PE)結合物を使用し、その陰性コントロール染色にはmouse IgG1-PE (Becton Dickinson, Mountain View, CA)を用いた。他の抗体の2次染色には抗CTLA-4抗体はrabbit anti goat IgG-fluorescein isothiocyanate (FITC) (SIGMA, St. Louis, MO), 残りの抗体はgoat anti mouse Ig (G+M)-FITC (KPL, MD)を用い、2次染色のみの陰性コントロール染色とした。通常の方法で染色後、FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA)にて解析を行った。

### 2.4 腫瘍細胞へのB7-1 (CD80) 遺伝子導入

B7-1発現ベクターは、SRαプロモーターをもつneomycin耐性発現ベクターpBJ<sup>22)</sup>のEcoRIサイトにB7-1 cDNAを組み込んだもので、順天堂大学免疫学教室、東みゆき先生よりご提供いただいた。neomycin耐性遺伝子のみのコントロールベクターとしては、上記B7-1発現ベクターの0.9 kbのEcoRI断片を切り出し、残りのDNAをセルフライゲーションしたものを使用した。遺伝子導入に際しベクターをSalIで直線化し、Gene Pulser (Bio-Rad, Grand Island, CA)を用いたエレクトロポレーション法 (300V, 960 µFD)を行い、24~48時間後よりG418 400 µg/ml (GIBCO BRL, Grand Island, NY)にてセレクションを開始した。10~14日後にG418耐性コロニーを分離、継代培養し、B7-1の発現のスクリーニングはフローサイトメトリー解析により行った。

### 2.5 MLTC (mixed lymphocyte tumor cell culture)

24穴プレート (Corning Coster, Corning, NY)の1穴あたり、 $1.0 \times 10^6$ 個のPBLと $5.0 \times 10^4$ 個の200 Gyの放射線照射を受けた腫瘍細胞を、rIL-2を含まないAIM-V培養液1 ml中で混合培養し、24時間後よりrIL-2 100 U/mlを加えた。2回目のMLTCは1週間後に同様の手順で行った。(Fig. 1)

### 2.6 TNFアッセイ

腫瘍細胞とPBLの応答でPBLより産生されるTNFα濃度を以下の方法で測定した。 $1 \times 10^4$ 個の200

Gy の放射線照射を受けた腫瘍細胞と、PBL を 1.25～10 の種々の E/T 比になるように混合し、rIL-2 を含まない AIM-V 培養液で最終容量 200  $\mu$ l とし、U 底 96 穴プレート (Corning Coster, Corning, NY) で培養した。抗体による抑制試験の際には、精製抗体を PBS 10  $\mu$ l 中に最終濃度が 0.1～10  $\mu$ l/ml になるように調製し、上記の反応液に加えた。24 時間後上清を回収し、その TNF $\alpha$  の濃度を Traversari らの方法<sup>23)</sup> に準じて calorimetric assay で測定した。簡単には、上清を TNF $\alpha$  高感受性細胞株 WEHI-164 clone 13<sup>24)</sup> に作用させ、同細胞の生存率を吸光度計 (BIO-RAD, Hercules, CA) にて測定した。同時に recombinant TNF $\alpha$  (大日本製薬) を用いて OD570 値と TNF $\alpha$  の濃度の対応を示す標準検量線を作成し、上清中の TNF $\alpha$  の濃度を求めた。

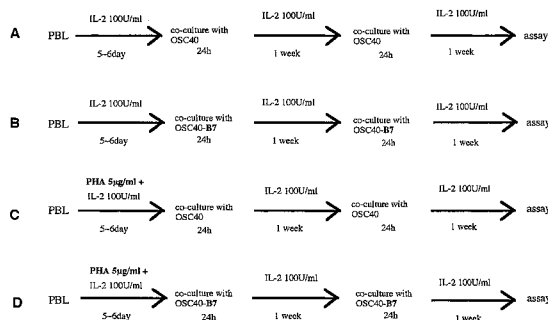
## 2.7 リンパ球増殖アッセイ

上記の培養の上清回収後、AIM-V 培養液を追加し合計 72 時間培養し、最後の 20 時間に 1 穴あたり 1  $\mu$ Ci の [<sup>3</sup>H] thymidine (DU Pont NEN, Boston, MA) にてラベルを行った。取り込まれた [<sup>3</sup>H] thymidine はセルハーベスター (SKATRON, Lier, Norway) にて回収し、液体シンチレーションカウンター (Beckman, Palo Alto, CA) で定量した。なお、追加する培養液に rIL-2 を含むものと含まないものの両方について検討した。

## 3 結果

### 3.1 B7-1 遺伝子導入株の樹立

B7-1 発現ベクターの遺伝子導入により、B7-1 を細

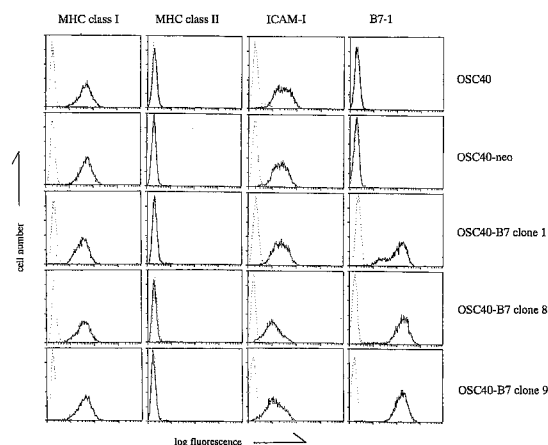


**Fig. 1** MLTC (Mixed lymphocyte tumor culture) protocol used in this study.  $1.0 \times 10^6$  PBL and  $5.0 \times 10^4$  irradiated tumor cells were co-cultured in 24-well-plates in AIM-V medium without exogenous IL-2 for 24 hours. Human rIL-2 (100 U/ml) was added during the each interval of MLTC.

胞表面に発現する OSC40-B7 clone 1, 8, 9, および B7-1 を含まないコントロールベクターの導入により neo-mycin 耐性株 OSC40-neo を得た (Fig. 2). B7-1 の発現レベルは 3 クローンとも同程度であり、G418 非存在下でも少なくとも 2 カ月間は安定した発現がみられた。遺伝子導入により MHC class I の発現レベルには大きな変化はなかった。また、B7-1 と協調して costimulation 機能を担うとされる CD54 (ICAM-1)<sup>25)26)</sup> は clone 8, 9 で軽度低下し、MHC class II は親株同様いずれも発現していなかった。

### 3.2 非刺激 PBL は B7-1 発現細胞に反応し増殖を促進する

B7-1 発現細胞に対する応答は、まず OSC40 抗原に感作されておらず、rIL-2 100 U/ml 存在下で培養し他の刺激は与えていない PBL について検索した。Fig. 3 に示すようにいずれの E/T 比においても、また OSC40-B7 の各クローンに対しても TNF $\alpha$  の低い産生をみるのみであった (Fig. 3A)。増殖反応は 24 時間後より rIL-2 を加えたアッセイでは、PBL のみの反応に比して OSC40 とそのトランスフェクタントが存在している方が増殖が促進されるが、その差はごく軽度であり B7-1 分子による増強効果も明らかではなかった (Fig. 3B)。



**Fig. 2** Expression of B7-1 and other cell surface molecules on OSC40 and its transfectants. B7-1 expression was assessed using the PE-conjugated anti-B7-1 mAb (L307.4) for cell staining. For other molecules, cells were stained with anti-MHC class I mAb (W6/32), anti-MHC class II mAb (TC8B1), and anti-ICAM-1 mAb (HA58), followed by FITC-conjugated goat anti mouse Ig(G+M). Samples were analyzed by flowcytometry. Negative control staining were shown in dashed line.

しかし 72 時間外来性 IL-2 非存在下で反応させると、E/T 比が 5 以上で有意に OSC40-B7 の 3 つのクローンに対してのみ増殖反応を示した (Fig. 3C)。

### 3.3 PHA 刺激 PBL は B7-1 発現細胞に反応し著しい $\text{TNF}\alpha$ の産生と増殖を起こす

上記の結果より、非刺激 PBL の中にごく一部にしか OSC40 の同種抗原に反応し得る T 細胞レパトリーが含まれていないか、あるいは同種抗原と B7-1 のみでは刺激が不十分でさらに第 3 の刺激を必要とするかのいずれかが考えられた。そこで PHA 刺激 PBL について同様の実験を行った。その結果 OSC40-B7 に反応させると 24 時間までに著しい  $\text{TNF}\alpha$  の産生が起こり (Fig. 4A), さらに 72 時間の培養では、OSC40-B7 との反応で有意に増殖が促進された。この増殖の差は外来性 IL-2 の有無によらず見られるが、IL-2 存在下では B7-1 を発現しない OSC40 に対してもある程度増殖が促進する (Fig. 4B) のに比して、IL-2 非存在下では OSC40-B7 に対してのみ増殖反応が見られた (Fig. 4C)。このことから B7-1 による刺激で外来性のサイトカインなしに自

律的に増殖することができることが示された。またこれらの反応において OSC40-B7 の 3 クローンの差はみられなかった。

### 3.4 PHA で刺激された PBL は細胞表面抗原を変化させる

PHA のリンパ球刺激は非特異的で、特定の T 細胞レパトリーを伸ばすとは考え難く、前述の PHA 刺激 PBL の反応増強効果はリンパ球全体が B7-1 の刺激を受けやすい状態になったためと考えられた。そこで PHA 刺激の有無による PBL の細胞表面抗原の変化をフローサイトメトリ解析にて検索した (Fig. 5)。その結果、

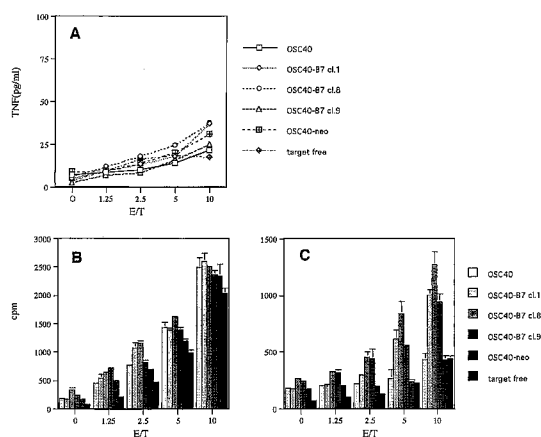


Fig. 3  $\text{TNF}\alpha$  production and proliferation of unstimulated PBL.

PBL and  $1 \times 10^4$  irradiated tumor cells were incubated at various E/T ratio in 96-well-U-bottom-plates under IL-2 free condition. A: After 24 hours, culture supernatants were harvested and  $\text{TNF}\alpha$  production were estimated by bioassay. Each point represent the mean of triplicate determinations. B: After 72 hours, proliferation was measured by [ $^3\text{H}$ ] thymidine incorporation for last 20 hours. Human rIL-2 (100 U/ml) was added after first 24 hours culture. Each point represent the mean of triplicate determinations. Error bars indicate S. E. C: Proliferation of unstimulated PBL without exogenous IL-2 was measured as B.

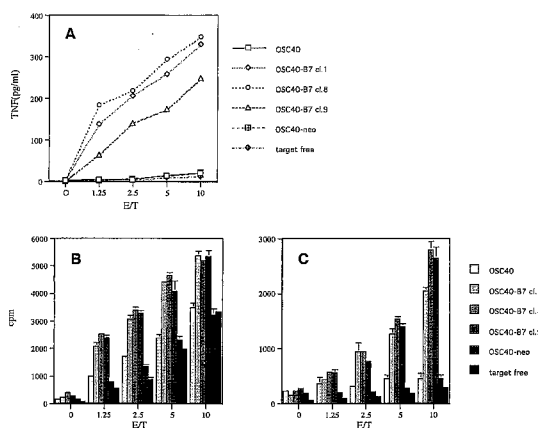


Fig. 4  $\text{TNF}\alpha$  production and proliferation of PHA stimulated PBL.

Both assay were performed as described in Fig. 3.

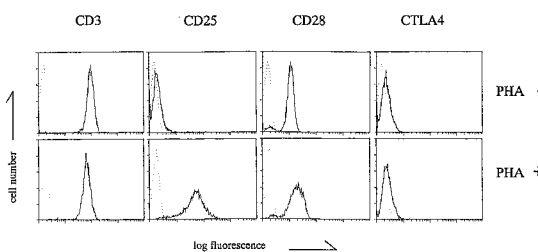


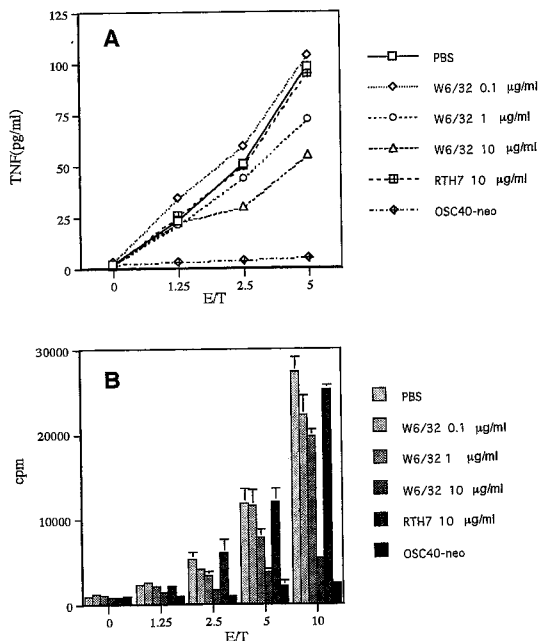
Fig. 5 Phenotype analysis on PBL with or without PHA stimulation.

PBL phenotype analysis was performed by cell surface staining using the anti-CD3 mAb (EF3), anti-CD25 mAb (TH9A5), anti-CD28 mAb (L293), followed by FITC-conjugated goat anti mouse Ig (G+M), and anti-CTLA4 polyclonal Ab, followed by FITC-conjugated rabbit anti goat IgG. Samples were analyzed by flowcytometry. Negative control staining were shown in dashed line.

非刺激 PBL に比して PHA 刺激 PBL では CD25 の発現が著しく増強した。CD28 も PHA 刺激により発現が軽度増強した。CTLA4 は、いずれもごく弱い発現が認められ差はなかった。

### 3・5 PHA 刺激 PBL は腫瘍細胞上の MHC class I と B7-1 の両方を認識して反応する

これまでに、スーパー抗原<sup>27)</sup>や PHA<sup>28)</sup>であらかじめ刺激されたリンパ球が CD28 刺激のみで増殖反応を示す実験系が報告されており、この OSC40-B7 に対する同種 PBL の反応も、OSC40 の MHC class I の認識とは無関係に、B7-1 による CD28 刺激のみで引き起こされた可能性も考えられた。そこで抗 MHC class I 抗体 W6/32 により増殖反応が抑制されるかどうか検討した。Fig. 6 に示すように、OSC40-B7 clone 9 に対する PBL の反応は TNF $\alpha$  産生 (Fig. 6A), 増殖反応 (Fig. 6B) のいずれも W6/32 により濃度依存性に抑制された。W6/32 と同じ IgG2a のコントロール抗体 RTH7 では抑制が起こらなかった。このことから PHA 刺激 PBL は、アロ MHC class I を認識し B7-1 の協調を伴って反応していることが示唆された。



**Fig. 6** Inhibition of the TNF $\alpha$  production and the proliferation of PHA-stimulated PBL by anti-MHC class I mAb (W6/32). W6/32 was added in assay described in Fig. 3 at 10  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, and 0.1  $\mu$ g/ml. Anti-rat CD4 mAb RTH7 was used at 10  $\mu$ g/ml as isotype matched control Ab.

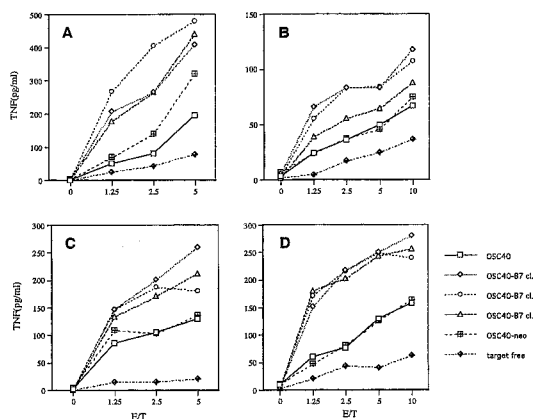
### 3・6 腫瘍細胞で刺激された PBL は、B7-1 非発現腫瘍細胞に弱く、B7-1 発現腫瘍細胞に強く反応する

リンパ球は腫瘍細胞による刺激、すなわち MLTC を繰り返し受けることにより特異的に刺激されたクローンが拡大することが期待される。そこで Fig. 1 に示す 4 種類のプロトコルにより MLTC を行い、それぞれの PBL の反応性を検討した。その結果、初めの PHA 刺激の有無、MLTC に用いた OSC-40 の B7-1 発現の有無にかかわらず様に、TNF $\alpha$  産生 (Fig. 7), 外来性 IL-2 存在下の増殖反応 (Fig. 8), 外来性 IL-2 非存在下の増殖反応 (Fig. 9) のいずれも OSC40-B7 によって著しい反応の増強をみた。PHA 刺激のみの PBL と異なるのは、OSC40-B7 よりは弱い B7-1 を発現していない OSC40, OSC40-neo によっても明らかに TNF $\alpha$  の産生が起こっていることである (Fig. 7)。これは以前の 2 回の MLTC で OSC40 反応性 T 細胞が活性化されていることを意味する。そして T 細胞の抗原認識相のみならずエフェクター相でも、B7-1 の発現が重要な役割をもっていることが示唆される。

## 4 考 察

### 4・1 B7-1 の腫瘍抗原認識における役割

T 細胞が抗原を認識し増殖するためには、第一の刺激としての MHC 分子 (ないしは MHC 分子と抗原ペ



**Fig. 7** TNF $\alpha$  production of PBL induced by various MLTC.

TNF assay was performed as described in Fig. 3. Various MLTC was performed in protocol described in Fig. 1. A: 2xMLTC with OSC40, B: 2xMLTC with OSC40-B7, C: PHA activated and followed by 2xMLTC with OSC40, D: PHA activated and followed by 2xMLTC with OSC40-B7.

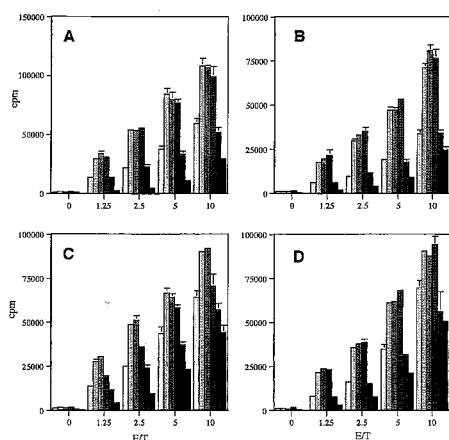


Fig. 8 Proliferation assay with exogenous IL-2 of PBL induced by various MLTC.

Proliferation assay with exogenous IL-2 was performed as described in Fig. 3. A: 2xMLTC with OSC40, B: 2xMLTC with OSC40-B7, C: PHA activated and followed by 2xMLTC with OSC40, D: PHA activated and followed by 2xMLTC with OSC40-B7.

プチドの複合体), 第二の刺激として B7 分子群を代表とする costimulatory 分子が必要であり, *in vitro* で B7/CD28 系の costimulatory signal を欠いた抗原刺激により T 細胞はアネルギーに陥るとされる<sup>1)28)</sup>. B7 分子群はいわゆる professional APC (antigen presenting cell) の B 細胞<sup>29)</sup>, マクロファージ<sup>30)</sup>, 樹状細胞<sup>31)</sup>, T 細胞に発現し<sup>32)33)</sup>, 上皮系腫瘍は普通は細胞表面に発現していない. 腫瘍細胞に B7 分子を遺伝子導入により発現させ, 腫瘍の拒絶効果を増強させる試みは腫瘍細胞自身が効果的に抗原提示を行うことを期待するものである.

マウスの *in vivo* の実験では, 最初に B7-1 分子を発現させた腫瘍細胞を皮下に移植すると退縮し, 2 回目の移植では B7-1 を発現しない腫瘍細胞に対しても拒絶反応が生じることが示されている<sup>17)18)</sup>. この最初の反応は, マウスの体内の腫瘍反応性 TCR を発現しているがアネルギーに陥っている T 細胞が B7-1 発現腫瘍細胞を認識して活性化されて直接傷害を示すようになったか, またはサイトカイン放出を介して周囲の T 細胞, NK 細胞の LAK 活性を誘導して引き起こされたためと考えられる. そしてこの腫瘍反応性 T 細胞はクローンを拡大し, 2 回目の移植では B7-1 非発現腫瘍細胞に対しても細胞傷害活性を持つようになったと考えられる. クローン化された T 細胞や CTL は, これらの誘導の過程では B7/CD28 系の costimulation を必要とするが, エ

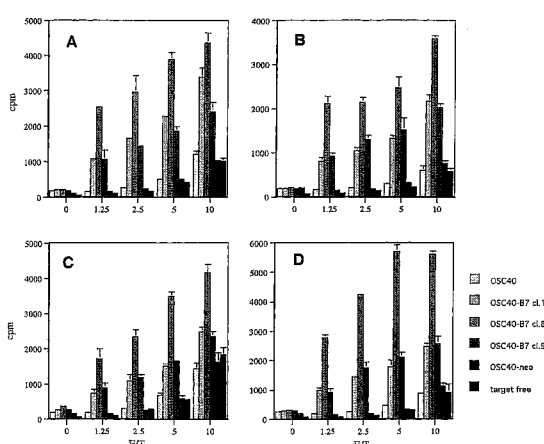


Fig. 9 Proliferation assay without exogenous IL-2 of PBL induced by various MLTC.

Proliferation assay without exogenous IL-2 was performed as described in Fig. 3. A: 2xMLTC with OSC40, B: 2xMLTC with OSC40-B7, C: PHA activated and followed by 2xMLTC with OSC40, D: PHA activated and followed by 2xMLTC with OSC40-B7.

フェクター相, つまり細胞傷害を行う際には不要であることが *in vitro* で示されており<sup>34)35)</sup>, このマウスの B7-1 発現腫瘍細胞によるワクチン効果の結果と符合する.

以上のシナリオには, 腫瘍細胞が特異的拒絶抗原を発現していることが大前提となる. ヒトの系ではこれまで腫瘍拒絶抗原をコードする遺伝子が多数同定されてきたが, この中には組織分化抗原に関連するもの<sup>36)37)</sup>や正常組織に広く発現するもの<sup>38)</sup>も含まれる. これらの抗原に反応する T 細胞は本来自己反応性であり, 胸腺でネガティブセレクションされるか, 末梢に存在していてもアネルギーに陥っているはずで, これらが活性化して腫瘍拒絶に働き得る機序は明らかにされていない. その機序のひとつに種々の costimulation によって活性化と抑制の均衡がくずれ, T 細胞が活性化に傾くことが考えられる. 膵島  $\beta$  細胞にウィルス糖蛋白と B7-1 を発現し, T 細胞にその糖蛋白特異的 TCR を発現した triple transgenic mouse ではリンパ球浸潤を伴う膵島炎が発生するが, ウィルス糖蛋白と TCR の double transgenic mouse では膵島炎は発症しないというモデルはこの仮説を裏付けている<sup>39)</sup>. さらにこの 2 種のマウスから機能的な差のみられないウィルス糖蛋白特異的 CTL が誘導されるという事実は, *in vivo* でアネルギー状態でも *in vitro* の種々の外来刺激で自己反応性 CTL が誘導され得ることを示している. 腫瘍細胞に

B7-1 分子を導入して生体に投与することは、*in vivo* でこの活性化シグナルを増強させる効果を期待させるが、腫瘍抗原そのものが質、量ともに不十分であったり、腫瘍に反応しうる T 細胞レポーターが欠如していればその効果は期待できないと思われる<sup>20)</sup>。

#### 4・2 B7-1 遺伝子導入 OSC40 による T 細胞活性化

著者はヒトの B7-1 発現腫瘍に対するリンパ球の応答を、抗原性が明らかと思われる同種のモデル、口底重層扁平上皮癌細胞株 OSC40 と同種 PBL を用いて解析した。そして未刺激の PBL で B7-1 発現細胞 OSC40-B7 による増殖反応を認めた (Fig. 3)。リンパ球をあらかじめ PHA で刺激しておくことこの増殖反応は増強し、TNF $\alpha$  の産生においても明らかな増強を認めた (Fig. 4)。特筆すべきは 72 時間外来性 IL-2 を加えない状況でも増殖がみられたことで (Fig. 4C)、間接的ではあるが B7-1 の刺激により自律的に増殖できるだけの IL-2 分泌が起こったと予想される。また抗 MHC class I 抗体で抑制がみられたことより (Fig. 6)、これらの反応は腫瘍細胞上の MHC class I と B7-1 を、それぞれ TCR と CD28 の natural ligand として認識して起こったことが示唆された。このように MHC class II を発現していない腫瘍細胞が、MHC class I と B7-1 の発現により充分に抗原性を発揮し得ることが示された。また予備実験では OSC40 の自己リンパ球においても、同種の場合より反応は弱いが OSC40-B7 により TNF $\alpha$  産生の増強がみられた。自己リンパ球は OSC40 の腫瘍抗原を認識している可能性があり、自己腫瘍の免疫療法に B7-1 による costimulation を利用できる可能性が示唆された。現在この自己リンパ球の反応をさらに増強させ、OSC40 特異的 CTL の誘導について検討中である。

#### 4・3 PBL の前刺激の意義

すでに述べたように、腫瘍細胞による T 細胞の強い活性化は、PBL を PHA で前刺激することで初めて得られた。PHA の効果については、フローサイトメトリー解析で CD25 (IL-2R $\alpha$ ) と CD28 の発現が増強することが確認され (Fig. 5)、T 細胞が CD28 を介して B7-1 の刺激をより多く受け、その結果の IL-2 分泌に対しての感受性も増加していることが示唆される。CD28 の細胞内シグナルの主体は CD28 の細胞内ドメインに結合した PI3-kinase の活性化による PI 代謝系シグナルと考えられているが<sup>40)</sup>、PHA が直接、あるいはチロシンキナーゼ系を介してこの代謝系の閾値を下げる効果を果たす可能性も考えられる。それでは生体内でこの PHA の代わりの役割を担うものは一体何であろうか。その

候補のひとつに B7-2 があげられる。最近、B7-1 は Th1 優位であるのに対して B7-2 は Th2 優位の T 細胞誘導を行う事実が示されているが<sup>41)42)</sup>、厳密に役割を分担するのではなく、それらの機能の一部は重複すると考えられる<sup>43)</sup>。B7-2 は B 細胞を刺激すると B7-1 に先だって発現し<sup>29)</sup>、共通のリガンド CTLA 4 に対する結合、遊離の割合が B7-1 よりやや高いことから<sup>44)</sup>、T 細胞の反応のごく初期に必要なであると予想される。B7-1 と B7-2 による CD28 細胞内シグナルの違いは不明であるが、いずれも PI3-kinase が動員されることから<sup>40)</sup>、あらかじめ細胞内シグナルの一部を入れて B7-1 によるシグナルを増強する効果があるのかもしれない。このほかに B7-1 に同調する因子として抗原提示細胞上の ICAM-1<sup>25)26)</sup>、HSA (heat stable antigen)<sup>45)</sup>、サイトカインでは IL-12<sup>46)</sup> などが報告されている。OSC40-B7 には B7-1、ICAM-1 は発現しているが、休止状態の PBL を活性化するにはさらに多数の costimulation を必要とするのだろう。いずれにせよ PHA である程度抗原刺激に対して準備状態にあったとはいえ、初回抗原認識の際に MHC class I に加えて B7-1 が重要であることには変わりはない。

#### 4・4 B7-1 の腫瘍特異的 T 細胞誘導における役割

B7-1 発現腫瘍細胞が抗原性を増強することを確認した上で、マウスの *in vivo* の実験で認められたワクチン効果の *in vitro* のモデルとして、MLTC で誘導したリンパ球の反応性を検討した。いずれの MLTC の方法でも結果はほとんど同じで、リンパ球は OSC40-B7 に強く反応した。しかし PHA 刺激リンパ球とは異なり、TNF $\alpha$  産生、増殖反応のいずれにおいても B7-1 を発現しない OSC40 に対しても明らかに反応した (Fig. 7, 8)。これは 2 回の MLTC によるワクチン効果と考えられる。前に述べたように T 細胞のエフェクター相には必ずしも標的細胞の B7-1 を必要としないという報告がある一方で<sup>32)33)</sup>、B7-1 発現腫瘍の TIL (Tumor infiltrating lymphocyte) から誘導された CTL が、B7-1 発現腫瘍細胞しか傷害しない例もある<sup>47)</sup>。この違いは、腫瘍細胞上の costimulation に関わる接着分子の量と質によるとこの報告者は考えているが、そのみではないと著者は考える。

ここで改めて腫瘍免疫が成立する 2 つの経路を考えたい。1 つは腫瘍細胞の MHC class I 上に提示される内因性ペプチドが、B7-1 をはじめとする活性化シグナルの助けを得てそれに反応しうる CD8 陽性 T 細胞を中心とした CTL を誘導する場合である。この場合は腫瘍細胞上の抗原及び接着分子の量、質が充分であれば、エ

フェクター相では B7-1 は必要なく、不十分なら必要になるだろう。もう 1 つは免疫系に限らず何らかの機序で破壊された腫瘍細胞の断片が、宿主の抗原処理、抗原提示システムを経て腫瘍特異的 CTL および Helper T 細胞を誘導する場合である。この場合は、腫瘍反応性 T 細胞の誘導そのものには腫瘍細胞上の B7-1 分子の有無は特に関係がないが、宿主の抗原提示細胞の MHC class II と抗原ペプチドを認識する CD4 陽性 T 細胞の役割が重要であると考えられる。エフェクター相ではこちらも腫瘍細胞上の抗原及び接着分子の量、質で B7-1 の必要性が決定されるが、この時には 1 次的に腫瘍細胞表面の抗原で誘導された CTL ではないので、反応のきっかけとしてまず腫瘍細胞の傷害が起こらなければならない場合が多いだろう。その際に腫瘍細胞上に B7-1 が発現しているとより傷害されやすいので、エフェクター相における B7-1 依存性はこちらの方が高いかもしれない。B7-1 発現細胞で初回の免疫を行うと、理論上この両方が起こりうるが、腫瘍細胞上に MHC class II を発現していなくても腫瘍免疫の成立に CD4 の関与がみられる場合<sup>48)</sup>はこの 2 番目の反応が主体になっていると考えられる。今回の MLTC の実験では、24 時間後に加えた rIL-2 が B7-1 非発現細胞による MLTC においても B7-1 による刺激効果を補ったため (Fig. 8)、MLTC の方法によって違いが認められなかったのだろう。一方で MLTC の際に腫瘍細胞は放射線照射を受けており 2~3 日で死滅するが、この結果上記の 2 番目の様式で腫瘍反応性 T 細胞が誘導されたと考えられる。この際わずかに混入している B 細胞やマクロファージ、T 細胞自身が抗原提示機能を担ったと予想される<sup>49)50)</sup>。また今回このようにして誘導された OSC40 反応性 T 細胞は外来性 IL-2 が与えられない場合、B7-1 非発現 OSC40 に対しては増殖反応を示さず (Fig. 9)、MLTC によりそれ程強い免疫効果は得られなかったと思われる。

生体内でこの 2 番目の様式で免疫が成立する場合、例えば放射線治療や化学療法により一度に大量に腫瘍が破壊されたり、血流途絶により腫瘍が壊死に陥ったりといった機序が考えられるが、腫瘍細胞に B7-1 が発現していれば第 1 次の細胞傷害が起こりやすくなり、次いで起こる免疫の成立の可能性が高まるだろう。このように機序は微妙に異なりながらも腫瘍細胞上の B7-1 分子は腫瘍免疫において大きな役割を果たす可能性がある。ただし抗原認識と T 細胞活性化に関わる種々の活性化、抑制シグナルのひとつだけの操作で簡単に都合のよい免疫制御ができると過信してはいけない。今

後も B7-1、B7-2 を初めとした B7 分子群と、CD28/CTLA4 の相互作用と、その他の多数の免疫制御分子の詳細な解析結果が蓄積されることを期待したい。

## 5 結 語

ヒト口底重層扁平上皮癌細胞株 OSC40 に B7-1 遺伝子を導入し、同種リンパ球の反応性の変化を観察した。また MLTC の際の B7-1 の役割について検討した。

- (1) 同種リンパ球は OSC40 の MHC class I 分子と B7-1 分子を認識して、TNF $\alpha$  を放出し、外来性 IL-2 非依存性に増殖した。これにより MHC class II を発現しないヒト上皮系腫瘍細胞が B7-1 遺伝子導入により *in vitro* で T 細胞を活性化することが示された。
- (2) 上記の反応には腫瘍細胞刺激に先立って PHA による刺激を必要とした。従って生体内の T 細胞の抗原認識、活性化の際にはさらに何らかの costimulation が必要であると考えられた。
- (3) MLTC により、B7-1 を発現しない OSC40 に対しても、T 細胞は TNF $\alpha$  の産生を増強し、外来性 IL-2 非依存性の増殖を行うようになった。B7-1 を発現した OSC40 に対してはより強く反応した。またこれらの反応性は MLTC に用いた OSC40 の B7-1 の発現の有無によって変わらなかった。

以上より、B7-1 遺伝子導入ヒト腫瘍細胞が T 細胞活性化を促進することが確かめられ、ヒト腫瘍免疫の制御に B7-1 分子が利用できる可能性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、B7-1 発現ベクターを御提供いただきました順天堂大学免疫学教室、東みゆき先生、御指導、御校閲いただきました当教室菊地浩吉教授、実験を進める上で科学的、技術的御助言をいただきました当教室高橋秀史先生、鳥越俊彦先生に感謝いたします。

## 参 考 文 献

1. Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. Science 1990; 248: 1349-1356.
2. Freeman GJ, Freedman AS, Segil JM, Lee G, Whitman JF, Nadler LM. B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. J Immunol 1989; 143: 2714-2722.



3. Azuma M, Ito D, Yagita H, Okumura K, Phillips JH, Lanier LL, Somoza C. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 1993, 366: 76-79.
4. Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, Ng JW, Restivo VJ, Lombard LA, Gray GS, Nadler LM. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 1993, 262: 909-911.
5. Aruffo A, Seed B. Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, 94: 8573-8577.
6. Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulate T cell proliferation and Interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med* 1991, 173: 721-730.
7. Brunet J-F, Denizot F, Luciani M-F, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei M-G, Golstein P. A new member of the immunoglobulin superfamily-CTLA-4. *Nature* 1987, 328: 267-270.
8. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in *Ctla-4*. *Science* 1995, 270: 985-988.
9. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995, 3: 541-547.
10. Linsley PS, Wallace PM, Johnson J, Gibson MG, Greene JL, Ledbetter JA, Singh C, Tepper MA. Immunosuppression in vivo by soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* 1992, 257: 792-795.
11. Azuma H, Chandraker A, Nadeau K, Hancock WW, Carpenter CB, Tilney N, Sayegh MH. Blockade of T-cell costimulation prevents development of experimental chronic renal allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93: 12439-12344.
12. Turka LA, Linsley PS, Lin H, Brady W, Leiden JM, Wei R-Q, Gibson ML, Zheng X-G, Myrdal S, Gordon D, Bailey T, Bolling SF, Thompson GB. T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89: 11102-11105.
13. Finck BK, Linsley PS, Wofsy D. Treatment of murine lupus with CTLA4Ig. *Science* 1994, 265: 1225-1227.
14. Lenschow DJ, Ho SC, Sattar H, Rhee L, Gray G, Nabavi N, Herold KC, Bluestone JA. Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J Exp Med* 1995, 181: 1145-1155.
15. Lu P, Zhou X, Chen SJ, Moorman M, Morris SC, Finkelman FD, Linsley P, Urban JF, Gause WC. CTLA-4 ligands are required to induce an in vivo interleukin 4 response to a gastrointestinal nematode parasite. *J Exp Med* 1994, 180: 693-698.
16. Corry DB, Reiner SL, Linsley PS, Locksley RM. Differential effects of blockade of CD28-B7 on the development of Th1 or Th2 effector cells in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 1994, 153: 4142-4248.
17. Chen L, Ashe S, Brady WA, Hellström I, Ledbetter JA, McGowan P, Linsley PS. Costimulation of antitumor immunity by the counter-receptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* 1992, 71: 1093-1102.
18. Townsend SE, Allison JP. Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science* 1993, 259: 368-370.
19. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996, 271: 1734-1736.
20. Chen L, McGowan P, Ashe S, Johnston J, Li Y, Hellstrom I, Hellstrom KE. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J Exp Med* 1994, 179: 523-532.
21. Nunes JA, Collette Y, Truneh A, Olive D, Cantrell DA. The role of p21 ras in CD28 signal transduction: triggering of CD28 with antibodies, but not the ligand B7-1, activates p21 ras. *J Exp Med* 1994, 180: 1067-1076.
22. Lin AY, Devaux B, Green A, Sangerström C, Elliott JF, Davis MM. Expression of T cell antigen receptor heterodimers in lipid-linked form. *Science* 1990, 249: 677-679.
23. Traversari C, van der Bruggen P, Van den Eynde B, Hainaut P, Lemoine C, Ota N, Old L, Boon T. Transfection and expression of a gene coding for a human melanoma antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes.

- Immunogenetics 1992, 35: 145-152.
24. Espevik T, Nissen-Meyer J. A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods* 1986, 95: 99-105.
  25. Damle NK, Klussman K, Leytze G, Myrdal S, Aruffo A, Ledbetter JA, Linsley PS. Costimulation of T lymphocytes with integrin ligands intercellular adhesion molecule-1 or vascular cell adhesion molecule-1 induces functional expression of CTLA-4, a second receptor for B7. *J Immunol* 1994, 152: 2686-2697.
  26. Cavallo F, Martin FA, Bellone M, Heltai S, Gatti E, Tornaghi P, Freschi M, Forni G, Delabona P, Casorati G. Co-expression of B7-1 and ICAM-1 on tumors is required for rejection and the establishment of a memory response. *Eur J Immunol* 1995, 25: 1154-1162.
  27. Edmead CE, Patel YI, Wilson A, Boulougouris G, Hall ND, Ward SG, Sansom DM. Induction of Activator Protein (AP)-1 and Nuclear Factor- $\kappa$ B by CD28 stimulation involves both phosphatidylinositol 3-kinase and acidic sphingomyelinase signals. *J Immunol* 1996, 157: 3290-3297.
  28. Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 1992, 356: 607-609.
  29. Boussiotis VA, Freeman GJ, Gribben JG, Daley J, Gray G, Nadler LM. Activated human B lymphocytes express three CTLA-4 counterreceptors that costimulate T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90: 11059-11063.
  30. Razi-Wolf Z, Freeman GJ, Galvin F, Benacerraf B, Nadler L, Reiser H. Expression and function of the murine B7 antigen, the major costimulatory molecule expressed by peritoneal exudate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89: 4210-4214.
  31. Larsen CP, Ritchie SC, Pearson TC, Linsley PS, Lowry RP. Functional expression of the costimulatory molecule, B7/BB1, on murine dendritic cell populations. *J Exp Med* 1992, 176: 1215-1220.
  32. Azuma M, Yssel H, Phillips JH, Spits H, Lanier LL. Functional expression of B7/BB1 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* 1993, 177: 845-850.
  33. Prabhu DM, Zamvil SS, Borriello F, Weiner HL, Sharpe AH, Kuchroo VK. Reciprocal expression of co-stimulatory molecules, B7-1 and B7-2, on murine T cells following activation. *Eur J Immunol* 1995, 25: 207-211.
  34. Azuma M, Cayabyab M, Buck D, Phillips JH, Lanier LL. CD28 interaction with B7 co-stimulates primary allogenic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small resting T lymphocytes. *J Exp Med* 1992, 175: 353-360.
  35. Harding FA, Allison JP. CD28-B7 interactions allow the induction of CD8+ cytotoxic T lymphocytes in the absence of exogenous help. *J Exp Med* 1993, 177: 1791-1796.
  36. Brichard V, Van PA, Wolfel T, Wolfel C, De PE, Lethe B, Coulie P, Boon T. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 1993, 178: 489-495.
  37. Bakker ABH, Schreurs MWJ, De Boer AJ, Kawakami Y, Rosenberg SA, Adema GJ, Figdor CG. Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1994, 179: 1005-1009.
  38. Ioannides CG, Fisk B, Fan D, Biddison WE, Wharton JT, O'Brian CA. Cytotoxic T cells isolated from ovarian malignant ascites recognize a peptide derived from the HER-2/neu proto-oncogene. *Cell Immunol* 1993, 151: 225-234.
  39. Harlan DM, Hengartner H, Huang ML, Kang YH, Abe R, Moreadith RW, Pircher H, Gray GS, Ohashi PS, Freeman GJ, Nadler LM, June CH, Aichele P. Mice expressing both B7-1 and viral glycoprotein on pancreatic beta cells along with glycoprotein-specific transgenic T cells develop diabetes due to a breakdown of T-lymphocyte unresponsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91: 3137-3141.
  40. Rudd CE. Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function. *Immunity* 1996, 4: 527-534.
  41. Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, Ranger AM, Zamvil SS, Sobel RA, Weiner HL, Nabavi N, Glimcher LH. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 1995, 80: 707-718.
  42. Freeman GJ, Boussiotis VA, Anumanthan A, Bernstein GM, Ke XY, Rennert PD, Gray GS, Gribben JG, Nadler LM. B7-1 and B7-2 do not

- deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity* 1995, 2: 523-532.
43. Lanier LL, O'Fallon S, Somoza C, Phillips JH, Linsley PS, Okumura K, Ito D, Azuma M. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J Immunol* 1995, 154: 97-105.
44. Morton PA, Fu XT, Stewart JA, Giacoletto KS, White SL, Leysath CE, Evans RJ, Shieh JJ, Karr RW. Differential effects of CTLA-4 substitutions on the binding of human CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2). *J Immunol* 1996, 156: 1047-54.
45. Liu Y, Jones B, Brady W, Janeway Jr. CA, Linsley PS. Co-stimulation of murine CD4 T cell growth: cooperation between B7 and heat-stable antigen. *Eur J Immunol* 1992, 22: 2855-2859.
46. Kubin M, Kamoun M, Trinchieri G. Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells. *J Exp Med* 1994, 180: 211-222.
47. Ramarathnam L, Castle M, Wu Y, Liu Y. T cell costimulation by B7/BB1 induces CD8 T cell-dependent tumor rejection: an important role of B7/BB1 in the induction, recruitment, and effector function of antitumor T cells. *J Exp Med* 1994, 179: 1205-1214.
48. Li Y, McGowan P, Hellstrom I, Hellstrom KE, Chen L. Costimulation of tumor-reactive CD4+ and CD8+ T lymphocytes by B7, a natural ligand for CD28, can be used to treat established mouse melanoma. *J Immunol* 1994, 153: 421-428.
49. Lanzavecchia A, Roosnek E, Gregory T, Ber-man P, Abrignani S. T cells can present antigens such as HIV gp120 targeted to their own surface molecules. *Nature* 1988, 334: 530-533.
50. Barnaba V, Watts C, de Boer M, Lane P, Lanzavecchia A. Professional presentation of antigen by activated human T cells. *Eur J Immunol* 1994, 24: 71-75.
- 
- 別刷請求先：  
(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目  
札幌医科大学医学部病理学第一講座 佐々木文